

DE 102004004906 A1

Anmeldeland: DE
Anmeldenummer: 102004004906
Anmeldedatum: 30.01.2004
Veröffentlichungsdatum: 01.09.2005
IPC-Version: 7
Hauptklasse: C07D 311/78
Nebenklasse: A61K 31/352
Nebenklasse: A61P 3/14
Nebenklasse: A61P 31/04
Nebenklasse: C12P 17/06
Indexklasse: C12P 17/06 C12R0001465000
MCD-Nebenklasse: A61K 31/352(2006.01,A)
MCD-Nebenklasse: A61P 3/14(2006.01,A)
MCD-Nebenklasse: A61P 31/04(2006.01,A)
MCD-Nebenklasse: C07D 311/78(2006.01,A)
MCD-Nebenklasse: C07D 493/08(2006.01,A)
MCD-Nebenklasse: C12P 17/06(2006.01,A)
CPC: C12P 17/06(2013.01)
CPC: C07D 493/08(2013.01)
ECLA: C07D 493/08
ECLA: C12P 17/06
Entgegenhaltung (NPL):Chem. Commun. (1999), S. 817-818
Entgegenhaltung (NPL):Nat. Prod. Rep. (1992), S. 103-137
Erfinder: BRINGMANN GERHARD, DE
Erfinder: BULL ALAN, GB
Erfinder: FIEDLER HANS-PETER, DE
Erfinder: HENTSCHEL UTE, DE
Erfinder: KOCHER NIKOLAUS, DE
Erfinder: LANG GERHARD, NZ
Erfinder: MAKSIMENKA KATJA, DE
Erfinder: MUELLER WERNER ERNST GEORG, DE
Erfinder: PETOVIC-OTTSTADT SANJA, DE
Erfinder: STALKE DIETMAR, DE
Anmelder: JOHANNES GUTENBERG UNI MAINZ, DE
Anmelder: JULIUS MAXIMILIANS UNI WUERZBU, DE

[EN]New oxygen-bridged angucyclinone derivatives, useful for treating bacterial infections and dementia, are modulators of intracellular calcium levels

[DE]O-Verbrückte Angucyclinone, Verfahren zu ihrer Herstellung, sie enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung

[EN]O-Bridged angucyclinones (I), their enantiomers, salts and solvates are new. O-Bridged angucyclinones of formula (I), their enantiomers, salts and solvates are new. R¹-R¹³= hydrogen, 1-18C linear, branched or cyclic alkyl (optionally substituted one or more times), alkenyl, (hetero)aryl or benzyl (all optionally substituted one or more times), acyl (e.g. (trichloro)acetyl, formyl, fumaryl, maleyl, succinyl or benzoyl), branched chain or heteroatom- or aryl-substituted acyl, hydroxy, mercapto, alkoxy (e.g. 1-4C alkoxy where the alkyl is linear, branched or cyclic), alkylthio (e.g. (m)ethylthio), sulfonyl (e.g. SO₃H, (trifluoro)methylsulfonyl, toluenesulfonyl or bromomethylphenylsulfonyl), or an N-bound substituent (e.g. amino (optionally substituted by 1 or 2 alkyl or aryl), cyano or nitro), fluoro, chloro, bromo, iodo, cyano or a heterosubstituent; or (MK#2)CR¹>R²>, CR⁴>R⁵>, CR⁶>R⁷> or CR⁸>R⁹>= C=O; and (MK#3) R¹⁴-R¹⁶= hydrogen, 1-18C linear, branched or cyclic alkyl (optionally substituted one or more times), alkenyl, (hetero)aryl or benzoyl (all optionally substituted one or more times), acyl (e.g. (trichloro)acetyl, formyl, fumaryl, maleyl, succinyl or benzoyl), branched chain or heteroatom- or aryl-substituted acyl, hydroxy, mercapto, alkoxy (e.g. 1-4C alkoxy where the alkyl is linear, branched or cyclic), alkylthio (e.g. (m)ethylthio), sulfonyl (e.g. SO₃H, (trifluoro)methylsulfonyl, toluenesulfonyl or bromomethylphenylsulfonyl). Independent claims are also included for the following: (1) method for producing (I) by culturing a Streptomyces; and (2) method for synthesis of (I) by isolation or (partial) synthesis of the corresponding tetracyclic compound, epoxidation and cyclization by an epoxide-opening reaction. [Image] ACTIVITY : Antibacterial; Neuroprotective. MECHANISM OF ACTION : (I) sensitizes neurons, i.e. they are analogs of glutamate and induce release of calcium from intracellular stores. Neuronal cells were incubated with 3 μg/ml gephyromycin (1a: (I) with R³= Me; R¹⁰= hydroxy all other R groups = hydrogen), 0.2 mM glutamate and 2.5 mM calcium, resulting in a sharp increase in the concentration of intracellular calcium after 10 minutes, i.e. increasing the 340 nm/380 nm ratio for Fura-2-AM from 0.845 to 1.826. A similar effect was obtained in absence of glutamate or when the cells were incubated first with (1a) and then with calcium.

[DE]Es werden das verbrückte Angucyclinon Gephyromycin (1a) und Derivate dieser Verbindung nach der allgemeinen Formel 1 DOLLAR F1 beschrieben sowie ein Verfahren zu ihrer Herstellung. Diese Substanzen erhöhen die intrazelluläre Calciumkonzentration in Neuronen. Weiterhin besitzen sie eine antibiotische Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien.

Seite 2 --- ()

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue bioaktive Verbindung aus einem Streptomyces, die als Gephyromycin bezeichnet wird, und ihre Derivate. Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der Verbindung, diese enthaltende Arzneimittel und deren Verwendung bei der Behandlung von Erkrankungen.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Streptomyceten sind filamentös wachsende Gram-positive Bakterien, die zur Ordnung der Actinomycetales gehören. Ein großer Teil aller medizinisch eingesetzten bakteriellen Naturstoffe wird von dieser Bakterienfamilie produziert. Die biologischen Aktivitäten von Streptomyces-Metaboliten sind sehr vielfältig, bekannte Verbindungen sind das antibakteriell breitspektrale Antibiotikum Streptomycin (Schatz et al. (1944) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 55:66-69), das immunsuppressive Macrolid Tacrolimus (Tanaka et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109:5031-5033) und das gegen Pilzinfektionen eingesetzte Amphotericin B (Sternberg et al. (1956) Antibiotics Ann. 566-573).

[0003] Eine wichtige Klasse von Streptomyces-Metaboliten sind die Angucycline, eine Gruppe von bakteriellen Sekundärmetaboliten mit einem typischen abgewinkelten tetracyclischen Kohlenstoffgerüst, das sich von Benz[a]anthrachinon ableiten läßt. Biosynthetisch sind die Angucycline mit den Tetracyclinen verwandt, welche allerdings eine lineare Anordnung der vier Ringe aufweisen. Die Naturstoffklasse der Angucycline, die inzwischen über 100 Vertreter zählt, kann in zwei Untergruppen aufgeteilt werden: die eigentlichen Angucycline, die immer säurelabile Glycoside sind, und Angucyclinone, die keine mit Säure abspaltbaren Zuckerreste besitzen. Viele dieser Verbindungen zeigen ausgeprägte biologische Aktivitäten, vor allem cytostatische und antibiotische Wirkungen sind bekannt. Es wurde aber auch von Hydroxylase- und Monooxygenase-Inhibitoren, von Blutplättchenaggregations-Hemmern und von antiviralen Angucyclinen berichtet (Rohr und Thiericke (1992) Nat. Prod. Rep. 9:103-137).

[0004] Aufgrund der ständig zunehmenden Resistenz von Bakterien und insbesondere Gram-positiven Bakterien gegenüber den herkömmlichen medizinisch verwendeten Antibiotika herrscht ein ständiger Bedarf an neuen antibakteriellen und bioaktiven Verbindungen. Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, solche neuen Verbindungen zur Verfügung zu stellen.

[0005] Die vorliegende Erfindung löst diese Aufgabe durch Bereitstellung des bisher nicht beschriebenen Naturstoffs Gephyromycin (1a) und Verbindungen der allgemeinen Struktur 1 (sowie deren diastereo- und enantiomere Formen), worin R₁ bis R₁₃ unabhängig voneinander entweder H, ein unsubstituiertes, monosubstituiertes oder polysubstituiertes C₁-C₁₈-Alkyl, wobei das Alkyl gerade, verzweigt oder cyclisch sein kann, Alkenyl, ein unsubstituierter, monosubstituierter oder polysubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest, eine unsubstituierte, monosubstituierte oder polysubstituierte Benzylgruppe, eine Acylgruppe, wie z. B. Formyl, Acetyl, Trichloracetyl, Fumaryl, Maleyl, Succinyl, Benzoyl, oder eine verzweigte oder Heteroatom- oder arylsubstituierte Acylgruppe, -OH oder -SH ein Alkoxy substituent, wie z. B. -OMe, -OEt, -ONPr, -OiPr, -ONBu, -OiBu, -OsecBu, -OtBu, dessen Alkylgruppe verzweigt, unverzweigt oder cyclisch ist, eine über ein Schwefelatom gebundene Alkylgruppe, wie z. B. -SMe, -SEt, oder eine Sulfonylgruppe, wie z. B. -SO₃H, -SO₂Me, -SO₂CF₃, -SO₂C₆H₄CH₃ oder SO₂C₆H₄CH₂Br, oder ein Stickstoffsubstituent, wie z. B. -NH₂, -NHR', -NRR' (mit R, R' = Alkyl, Aryl usw.), -NC oder -NO₂, oder Fluor,

Seite 3 --- ()

Chlor, Brom, Iod, -CN oder ein Heterosubstituent sind,

oder an Stelle von einem oder mehreren der Substituentenpaare R₁/R₂, R₄/R₅, R₆/R₇ und R₈/R₉ sich eine Ketofunktion befindet, R₁₄, R₁₅ und R₁₆ unabhängig voneinander entweder H, ein unsubstituiertes, monosubstituiertes oder polysubstituiertes C₁-C₁₈-Alkyl, wobei das Alkyl gerade, verzweigt oder cyclisch sein kann, Alkenyl, ein unsubstituierter, monosubstituierter oder polysubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest, eine unsubstituierte, monosubstituierte oder polysubstituierte Benzylgruppe, eine Acylgruppe, wie z. B. Formyl, Acetyl, Trichloracetyl, Fumaryl, Maleyl, Succinyl, Benzoyl, oder eine verzweigte oder Heteroatom- oder arylsubstituierte Acylgruppe, oder eine Sulfonylgruppe, wie z. B. -SO₃H, -SO₂Me, -SO₂CF₃, -SO₂C₆H₄CH₃ oder SO₂C₆H₄CH₂Br sind.

[0006] Es wurde überraschenderweise gefunden, daß Gephyromycin und seine Derivate eine selektive und nicht vorhersehbare antimikrobielle Aktivität gegen Gram-positive Bakterien besitzen. Aufgrund dieser Eigenschaft sind die hier beschriebenen Substanzen geeignet zur Behandlung von Infektionen, die durch solche Bakterien ausgelöst werden.

[0007] Weiterhin wurde überraschenderweise gefunden, daß der Naturstoff Gephyromycin (1a) eine ausgeprägte und nicht vorhersehbare Wirkung auf Neuronen besitzt. Es wurde gefunden, daß Gephyromycin (1a) die Neuronen sensibilisiert. Die Substanz wirkt somit z.B. wie ein Analogon des Neurotransmitters Glutamat. Calcium wird nach der Inkubation mit Gephyromycin auch aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Aufgrund dieser Eigenschaften könnte die hier beschriebene Substanz einen großen Einfluß auf die Sinneswahrnehmung und auf das Langzeitgedächtnis haben. Es wird somit erfindungsgemäß vorgesehen, diese Substanz oder ihre Derivate entweder in der vorliegenden Form oder in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz anzuwenden.

[0008] Die erfindungsgemäßen Verbindungen können mit den üblichen Lösungsmitteln, Hilfs- und Trägerstoffen zu Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- und Infusionszubereitungen verarbeitet werden, um therapeutisch zur peroralen, rektalen oder parenteralen Applikation Verwendung zu finden.

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer oben genannten Verbindung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Substanz aus einem Actinomyceten der Gattung Streptomyces isoliert wird. Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde Streptomyces sp. Stamm KC 1030 erstmalig als bevorzugter Produzent der erfindungsgemäßen Verbindungen nachgewiesen.

[0010] Der Actinomycetenstamm KC 1030 wurde aus einer Erdprobe isoliert, die in der Terra Nova Bay, Antarktis, gesammelt worden war. Er weist die nachfolgend beschriebenen morphologischen und chemotaxonomischen Merkmale auf. Der Stamm wächst als Oberflächenkultur auf standardmäßigen Komplexmedien, wie z. B. dem ISP-2-Agarmedium (0,4 % Glucose, 1 % Malzextrakt, 0,4 % Hefeextrakt), mit einem hellgelb gefärbtem Substratmyzel und einem weißen Luftmyzel, dessen Sporen beige-grau gefärbt sind. Der Stamm produziert Melanin. Im Hydrolysat des Peptidoglucans ist ausschließlich LL-Diaminopimelinsäure nachweisbar und charakterisiert den Stamm KC 1030 der Gattung Streptomyces zugehörig.

[0011] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung der oben genannten Verbindungen zur Behandlung von Krankheiten, die mit Gedächtnisstörungen verbunden sind (z. B. Demenz-Krankheiten). Diese Verwendung kann zum Beispiel in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz erfolgen. Im Falle der Behandlung ist eine Behandlung in vivo in einem Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 10,0 µg/ml vorgesehen. Es sind jedoch auch andere Konzentrationen möglich, die der Fachmann problemlos an den jeweiligen Bedarf anpassen kann.

[0012] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine erfindungsgemäße Verbindung, zusammen mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffen. Diese pharmazeutische Zusammensetzung kann dadurch gekennzeichnet sein, daß die Verbindung in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz vorliegt.

[0013] Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter einem "Derivat" eine von der allgemeinen Formel 1 abgeleitete Verbindung sein, die zum Beispiel durch verschiedene der oben für R₁ bis R₁₆ angegebenen Restgruppen substituiert ist, sowie Gemische verschiedener dieser Verbindungen, die zum Beispiel zu einem auf

Seite 4 --- ()

die jeweils zu therapierende Erkrankung und/oder den Patienten auf Basis von diagnostischen oder Daten über den Behandlungserfolg oder -verlauf abgestimmten "personalisierten" Medikament verarbeitet werden können. Unter einem Derivat wird auch eine Verbindung der Angucyclinon-Klasse

verstanden, die aus anderen Organismen isoliert werden kann, als den hier (beispielhaft) erwähnten, oder die z. B. durch Partialsynthese aus nicht-verknüpften Angucyclinonen oder durch Totalsynthese hergestellt werden kann.

[0014] Die Erfindung soll nun im folgenden anhand von Beispielen näher verdeutlicht werden, ohne jedoch auf diese Beispiele irgendwie beschränkt zu sein.

[0015] In den beigefügten Figuren zeigt:

[0016] Fig. 1: die aus den NMR-Daten bestimmte Struktur von Gephyromycin (1a) im Vergleich zur Molekülstruktur im Kristall.

[0017] Fig. 2: den Vergleich des gemessenen CD-Spektrums von Gephyromycin (1a) mit den für die O-acetylierten Derivate der beiden möglichen Enantiomere berechneten Spektren.

[0018] Fig. 3: die Behandlung der Neuronen mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Gephyromycin (1a), 200 μM L-Glutaminsäure und 2,5 mM Ca^{2+} (\bullet); Präinkubation (5 Minuten) der Neuronen mit 3 (o) $\mu\text{g/ml}$ Gephyromycin (1a) nach Zugabe (10 Minuten) von 200 μM L-Glu und 2,5 mM CaCl_2 . Die Änderungskinetik wurde kontinuierlich etwa 25 Minuten lang gemessen. Der Mittelwert ($n = 36$ – 42) als auch die Standardabweichung (\pm ; SE) wurden ermittelt.

[0019] Fig. 4: die Inkubation der Neuronen mit 3 $\mu\text{g/ml}$ Gephyromycin (1a) und 2,5 mM Ca^{2+} (\bullet); Präinkubation (5 Minuten) der Neuronen mit 3 (o) $\mu\text{g/ml}$ Gephyromycin (1a) nach der Zugabe (10 Minuten) von 2,5 mM CaCl_2 . Die Änderungskinetik wurde kontinuierlich etwa 25 Minuten lang gemessen. Der Mittelwert ($n = 35$ – 50) als auch die Standardabweichung (\pm ; SE) wurden ermittelt.

Beispiel 1: Gewinnung von Gephyromycin aus biologischem Material. Produktion von Gephyromycin durch den Streptomyceten-Stamm KC 1030:

[0020] Gephyromycin wird vom Streptomyceten-Stamm KC 1030 während der logarithmischen bis hin zur stationären Wachstumsphase produziert. Eine typische Fermentation verläuft folgendermaßen: Ein 20-Liter-Fermenter wird mit 19 Liter Komplexmedium (1 % Glucose, 1 % Stärke, 1 % Glycerin, 0,25 % Corn Steep Powder, 0,5 % Pepton, 0,2 % Hefeextrakt, 0,1 % NaCl, 0,3 % CaCO_3 , pH 7,3) gefüllt. Der Fermenter wird mit 5 Volumen-% einer 48-stündigen Schüttelkultur (500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich, 100 ml Komplexmedium, 120 Upm, 27 $^\circ\text{C}$) angeimpft. Der Fermenter wird bei 27 $^\circ\text{C}$, einer Drehzahl von 250 Upm und einer Belüftung von 0,5 vvm 3-4 Tage lang inkubiert. Gephyromycin ist mit HPLC-Diodenarraydetektion (HPLC-DAD) im Kulturfiltratextrakt nachweisbar.

Isolierung von Gephyromycin:

[0021] Die Fermenterbrühe (20 Liter) wird unter Zusatz von 2 % Filterhilfsmittel (Hyphlo-Supercel) in Biomasse und Kulturfiltrat getrennt. Die Biomasse wird verworfen. Das im Kulturfiltrat vorliegende Gephyromycin wird im Chromatographieverfahren an einem Polystyrolharz vom Typ Amberlite XAD-16 adsorbiert (100 \times 5 cm), Verunreinigungen werden mit Wasser und 60%igem wäßrigem Methanol eluiert und Gephyromycin wird mit 80%igem wässrigem Methanol desorbiert. Das Gephyromycin-enhaltende Eluat wird am Vakuumrotationsverdampfer bis zum wäßrigen Rückstand konzentriert, der auf pH 4 eingestellt und zwei Mal mit Ethylacetat extrahiert wird. Die vereinigten organischen Extrakte werden am Vakuumrotationsverdampfer zur Trockene konzentriert. Das darin enthaltene Gephyromycin wird durch Niederdruck-Chromatographie an einer LiChroprep-Diol-Säule (40 \times 2,6 cm) und mit einem linearen Gradienten von Dichlormethan zu Dichlormethan/Methanol (70 + 30) in 3 Stunden bei einem Fluß von 2 ml/min gereinigt. Durch zwei nachfolgende Ausschluss-Chromatographie-Schritte, zum einen an einer Sephadex-LH-20-Säule (90 \times 2,5 cm) und zum anderen an einer Fractogel-TSK-HW-40-Säule (90 \times 2,5 cm) in Methanol bei einem Fluß von 0,5 ml/min, wird Gephyromycin als Reinsubstanz erhalten.

Seite 5 --- ()

HPLC-DAD-Analytik des Gephyromycins: Chromatographische Ausstattung:

[0022] HP 1090 Liquid Chromatograph mit Diodenarray-Detektionssystem und HP Kayak XM 600-ChemStation mit HPLC-Software A.08.03 (Agilent Technologies). Die Mehrkanaldetektion erfolgte bei 210, 230, 260, 280, 310, 360, 435 und 500 nm, die UV-Vis-Spektren wurden bei 200-600 nm registriert.

Trennparameter:

[0023] HPLC-Säule gefüllt mit Nucleosil-100 C-18 (125 \times 4,6 mm, Vorsäule 20 \times 4,6 mm, Korngröße 5 μm ; Macherey & Nagel). Lineare Gradientenelution von 100 % wäßriger o-Phosphorsäure (0,1 % v/v) zu 100 % Acetonitril in 15 min bei einem Fluß von 2 ml/min. Das Injektionsvolumen beträgt 10 μl . Die Retentionszeiten betragen für Gephyromycin 7 min. Außer durch die Retentionszeit wird Gephyromycin anhand seines charakteristischen UV-Vis-Spektrums identifiziert.

[0024] Spektroskopische Daten und Strukturaufklärung von Gephyromycin: IR (KBr): ν_{max} = 3422 (br.), 2930 (m), 1742 (s), 1706 (m), 1655 (s), 1458 (m), 1329 (m), 1279 (m), 1232 (m), 1185 (m), 1161 (m), 1098 (m), 1055 (m) cm^{-1} .

MS (EI): m/z (%): 374 [M^+] (100), 356 (11), 274 (12), 253 (13), 245 (18), 233 (13), 217 (12), 189 (17), 121 (21), 43 (37).

Seite 6 --- ()

Tabelle 1. NMR-Daten von Gephyromycin (1a) in Dioxan- d_8 .

Seite 7 --- ()

Tabelle 2. NMR-Daten von Gephyromycin (1a) in CDCl_3 .

[0025] Schon die Zahl von 19 Kohlenstoffsignalen im ^{13}C -NMR-Spektrum deutete darauf hin, daß es sich hier um ein Angucyclinon handelte. Durch die Auswertung der restlichen NMR-Daten, aufgenommen in CDCl_3 , wurde diese Vermutung bestätigt und alle Kohlenstoff- und Protonensignale konnten ihrer Position im Angucyclingerüst zugeordnet werden. Die aromatischen Protonen 9-H, 10-H und 11-H wurden dem D-Ring (Bezeichnung der vier annelierten Ringe in Angucyclinonen: A bis D, von links nach rechts) des Angucyclinongerüsts zugeordnet. Über die HMBC-Korrelationen dieser Signale wurden die übrigen Kohlenstoffatome des D-Rings (C-7a, C-8 und C-11a) identifiziert; auch Kopplungen zu den Carbonylkohlenstoffen des C-Rings (C-7 und C-12) waren zu erkennen. Ausgehend von den Protonensignalen von 13-H und den zwei Methylengruppen (2-H und 4-H) ließen sich durch HMBC-Wechselwirkungen die ^{13}C -Signale des A-Ringes mit seiner Ketogruppe C-1 und den zwei quartären Kohlenstoffatomen C-4a und C-12b, die die Verbindung zum B-Ring bilden, vollständig zuordnen. Die hohe $^2J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2-H $_{\text{agr}}$ und 2-H $_{\text{bgr}}$ (19,0 Hz) belegte noch zusätzlich die Lage dieser Methylengruppe neben einer Carbonylfunktion. Von den zwei übrigen Methylengruppen C-5 und C-6, die folglich Teil des B-Ringes waren, sah man HMBC-Wechselwirkungen zu den quartären Kohlenstoffatomen C-6a und C-12a, die somit den Übergang vom B- zum C-Ring bilden mußten.

[0026] Die ^{13}C -Verschiebungen der fünf quartären C-Atome C-3 (75,9 ppm), C-4a (71,7 ppm), C-6a (77,4 ppm), C-12a (79,9 ppm), C-12b (78,5 ppm) zeigten nicht nur, daß keines dieser Atome an einer Doppelbindung beteiligt war, sondern deuteten auch auf tertiäre Alkohole, Ether oder Epoxide hin. Zusammen mit der aus der exakten Masse bestimmten Summenformel von $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_8$ ergab sich folgendes Bild: an drei dieser fünf quartären Kohlenstoffe befinden sich Hydroxylgruppen, während die restlichen zwei über eine Etherbrücke verbunden sind.

[0027] Zur Bestimmung der Position der Hydroxylgruppen und der Etherbrücke wurden HMBC- und ROESY-Spektren der Verbindung in Dioxan- d_8 aufgenommen. In diesem Lösungsmittel ergeben aliphatische Alkohole oft scharfe Signale. Wie erwartet enthielt das Protonenspektrum drei zusätzliche Singulett-Signale von OH-Gruppen, aus deren HMBC-Wechselwirkungen ersichtlich war, daß sie sich an C-4a, C-6a und C-12b befanden. Daraus folgte eine intramolekulare Etherbrücke zwischen C-3 und C-12b. Dieser Befund wurde auch durch die im HMBC sichtbare $^4J_{\text{HC}}$ -Kopplung zwischen 13-H und C-12a gestützt. Ein weiterer Hinweis auf eine derartige Verbrückung war die sehr hohe $^4J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstante von 2,5 Hz (in CDCl_3) zwischen 2-H_{bg} und

Seite 8 --- ()

4-H_{bg}; die völlig starre Konformation des A-Ringes führt zu einer 'W'-Anordnung der Bindungen zwischen diesen beiden äquatorialen Protonen und ermöglicht dadurch eine deutliche Kopplung über vier Bindungen. Entsprechend zeigte das axiale Proton 4-H_{agr} eine ROESY-Wechselwirkung zu einem der Protonen an C-2.

[0028] Die $^3J_{\text{HH}}$ -Kopplungskonstanten zwischen 5-H_{agr}, 5-H_{bg}, 6-H_{agr} und 6-H_{bg} ließen Schlüsse über die Konformation des B-Ringes zu. Die Kopplungskonstante von ~14 Hz zwischen 5-H_{bg} und 6-H_{bg} zeigte, daß diese Protonen zueinander in anti-Stellung stehen.

[0029] Die relative Konfiguration der vier Stereozentren C-3, C-4a, C-12a und C-12b ergab sich automatisch wegen sterischer Zwänge der sehr starren verbrückten Struktur. Unklar war zunächst nur die relative Konfiguration an C-6a, hier waren theoretisch beide Konfigurationen möglich. Geklärt wurde diese Frage durch die in Dioxan- d_8 gemessenen ROESY-Spektren. Da alle drei Hydroxylprotonen am B-Ring mit 5-H_{bg} wechselwirkten, war gesichert, daß diese drei OH-Gruppen alle auf derselben Seite des B-Ringes liegen. Die Konfiguration des Moleküls ist also entweder (3S, 4aS, 6aS, 12aR, 12bR) oder (3R, 4aR, 6aR, 12aS, 12bS).

[0030] Die Konstitution und relative Konfiguration von Gephyromycin (1a) konnten durch eine Einkristallstrukturanalyse verifiziert werden. Auch die über Kopplungskonstanten und ROESY-Wechselwirkungen vorhergesagte Konformation stimmte exakt mit der Struktur im Kristall überein. Aufgrund der verbrückten Angucyclinonstruktur und der Herkunft aus einem Streptomyceten wurde die Verbindung Gephyromycin genannt. Kristallographische Daten für Gephyromycin (1a): Datensammlung:

Diffraktometer: Bruker Smart Apex mit D8-Goniometer
Strahlung: Mo K α
Monochromator Graphit
Kristallgröße [mm]: 0,30 \times 0,25 \times 0,10
Datenaufnahmemodus: ω -scan
 θ -Bereich [Grad]: 2,58–25,71
Reziproke Gitterkonstante $a = 9 \text{ \AA}$
 $b = 10 \text{ \AA}$
 $c = 16 \text{ \AA}$
Zahl der gemessenen Reflexe: 10505
davon symmetrieunabhängig: 3303
beob. Reflexe $I > 2\sigma(I)$: 3216
Lin. Abs. Koeff. [mm $^{-1}$]: 0,12
Abs. Korrektur: empirisch (SADABS 2.05)

Seite 9 --- ()

Strukturanalyse und Verfeinerung:

Verhältnis Parameter/ F_0 : 9,4
 R , R_w (alle Reflexe) 0,051; 0,127
Maximal positive Resteletronendichte: 0,42 e \AA^{-3}
Maximal negative Resteletronendichte: 0,29 e \AA^{-3}
verwendetes Programm: SHELXL-97

Atompositionen [$\times 10^4$] und isotrope Temperaturkoeffizienten $U(\text{eq})$ [$\text{pm}^2 \times 10^{-1}$]

[0031] Die isotropen Temp.-Koeffizienten $U(\text{eq})$ sind definiert als ein Drittel der Spur des orthogonalisierten U_{ij} -Tensors.

Seite 10 --- ()

[0032] Die asymmetrische Einheit des Gephyromycin-Kristalls enthält neben einem Molekül Gephyromycin noch ein Molekül Methanol [C(140) und O(140)].

Aufklärung der absoluten Konfiguration von Gephyromycin.

[0033] Die Untersuchung des Circular dichroismus (CD) ist ein leistungsfähiges Verfahren zur Bestimmung der absoluten Konfiguration chiraler Verbindungen (Bringmann et al. (2001) J. Comp. Chem. 22:1273-1278). Da es sich bei Gephyromycin (1a) jedoch um einen völlig neuen Strukturtyp handelt, konnte hier nicht einfach eine Zuordnung der absoluten Konfiguration durch Vergleich des CD-Spektrums mit dem einer strukturell verwandten konfigurativer bekannten Substanz vorgenommen werden. Die Zuordnung gelang aber durch Anwendung moderner quantenchemischer CD-Rechnungen (Bringmann und Busemann (1998) in Natural Product Analysis (Eds.: P. Schreiber, H. U. Humpf, W. Schwab), Vieweg, Wiesbaden, 195-212). Dies geschah durch Simulation der für die beiden in Frage kommenden Enantiomere zu erwartenden CD-Spektren und Vergleich dieser rechnerisch vorhergesagten Spektren mit dem tatsächlich für den Naturstoff experimentell gemessenen Spektrum (Bringmann et al. (2003) J. Nat. Prod. 66:1159-1165; Bringmann et al. (2002) J. Org. Chem. 67:5595-5610; Bringmann et al. (2001) J. Comp. Chem. 22:1273-1278).

[0034] Um mögliche Konformere und deren Energien zu ermitteln, wurde die Struktur einer Konformationsanalyse mit der semiempirischen AM1-Methode (Dewar et al. (1985) J. Am. Chem. Soc. 107:3902-3909) unterzogen. Wegen der starren Struktur wurden nur elf Konformere gefunden; sie alle rührten von der Flexibilität der Hydroxylgruppen her und wiesen eine maximale Energiedifferenz von 3 kcal/mol vom globalen Minimum auf. Zu jedem Konformer bestimmte man mit der semiempirischen OM2-Methode (Weber et al. (2000) Theor. Chem. Acc. 103:495-506) rechnerisch das theoretische CD-Spektrum. Diese Spektren wurden nach den Bildungsenthalpien der einzelnen Konformere gewichtet und zu einem theoretischen Gesamtspektrum des entsprechenden Enantiomers addiert. Leider war es anhand dieser Spektren so noch nicht möglich, Rückschlüsse auf die absolute Konfiguration von Gephyromycin zu ziehen. Da der Grund für die schlechte Übereinstimmung der berechneten mit dem gemessenen Spektrum vermutlich in der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Hydroxylgruppen untereinander und mit den Carbonylsauerstoffen lag, wurden diese OH-Gruppen für eine weitere Berechnung durch Acetoxygruppen ersetzt. Das für das (3S, 4aS, 6aS, 12aR, 12bR)-Enantiomer der acetylierten Verbindung berechnete Spektrum zeigte eine gute Übereinstimmung mit dem Spektrum des Gephyromycins (**Abb. 2**; linke Seite), während das berechnete

Spektrum des (3R, 4aR, 6aR, 12aS, 12bS)-Enantiomers annähernd spiegelbildlich zu dem des Naturstoffes war (**Abb. 2**; rechte Seite). Anhand dieser Ergebnisse war es möglich, dem natürlichen Gephyromycin (1a) mit großer Sicherheit die (3S, 4aS, 6aS, 12aR, 12bR)-Konfiguration zuzuordnen. Dieses Ergebnis wurde noch einmal durch O-Acetylierung von 1a (siehe unten) und CD-Untersuchung des Produktes überprüft.

Beispiel 2: O-Acetylierung von Gephyromycin (1a)

[0035] In 1 ml Essigsäureanhydrid/Pyridin (1:1) wurden 2 mg Gephyromycin (1a) und 1 mg Dimethylaminopyridin gelöst. Nach einer Reaktionszeit von 48 Stunden wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum zur Trockne eingedampft und der Rückstand durch präparative HPLC aufgereinigt. Man erhielt 1,5 mg Tetra-O-acetylgephyromycin (1b) als weißen amorphen Feststoff. Die spektroskopischen Daten stehen im Einklang mit der postulierten Struktur.

1b Beispiel 3: Antimikrobielle Aktivitäten Anzucht von Mikroorganismen:

[0036] Die Referenzstämme wurden aus der bei -80°C gelagerten Stammsammlung mit einem sterilen Zahnstocher auf LB-Agarplatten ausgestrichen und für einen Tag bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zur Erstellung

Seite 11 --- ()

von Übernacht-Kulturen (ÜN) wurden 3 ml des jeweiligen Flüssigmediums in einem Kulturröhrchen mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers angeimpft und auf dem Schüttler bei der entsprechenden Temperatur über Nacht inkubiert. Das Set aus Referenzorganismen bestand aus Gram-positiven (*Staphylococcus aureus* 118 (wt), *S. aureus* A134 (MRSA), *B. subtilis* 168 (wt) und Gram-negativen Bakterien (*Escherichia coli* DHS Δ gr), einem eukaryontischen Pilz (*Candida albicans*) sowie einem marinen Isolat (*Vibrio* sp. SB1). Die Referenzstämme wurden über Nacht wie folgt angezogen: *S. aureus*, *B. subtilis* und *E. coli* bei 37°C in LB-Medium, *C. albicans* bei 30°C in YPD-Medium und *Vibrio* sp. SB1 bei Raumtemperatur in ZoBell-Medium. Die ÜN-Kulturen wurden mit sterilem Medium auf eine $\text{OD}_{600} = 1,0$ eingestellt und anschließend 1:200 verdünnt. Das Isolat *Vibrio* sp. SB1 wurde 1:1 mit Zobell-Medium verdünnt. Die Proben wurden mit dem Vortexer geschüttelt und jeweils 100 μl wurden auf Agarplatten als Rasen ausplattiert.

Durchführung des Agardiffusionstests:

[0037] Die antimikrobielle Aktivität von Gephyromycin (1a) wurden mit Hilfe des Agardiffusionstests bestimmt. Hierzu wurden die Referenzstämme *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans*, *Vibrio* sp., wie oben beschrieben, angezogen und als Rasen ausplattiert. Von der Testsubstanz wurden je 160 μg , in 20 μl Methanol gelöst, auf sterile Filterpapierblättchen gegeben. Nach Verdunsten des Lösungsmittels unter dem Abzug wurden die Plättchen auf die frisch ausplattierten Rasen der Referenzstämme gelegt und die Platten bei der für den jeweiligen Referenzstamm optimalen Temperatur inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen und die Durchmesser der Hemmhöfe in mm ausgemessen.

Ergebnis:

[0038] Bei einer Substanzmenge von 160 μg pro Blättchen wurde bei den Stämmen *S. aureus* A134 und *B. subtilis* 168 ein Hemmhof mit einem Durchmesser von je 9 mm beobachtet. Gegenüber den übrigen Teststämmen zeigte die Substanz keine Wirkung.

Beispiel 4: Nachweis des Einflusses von Gephyromycin (1a) auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration in Neuronen A) Messungen Material:

[0039] Es wurden die gleichen Materialien wie in Perovic et al. (1998, Mech. Ageing Dev. 101:1-19) beschrieben verwendet. Fura-2-Acetoxymethylester (Fura-2-AM) wurde von Molecular Probes (Leiden, Niederlande), „Dulbecco's modified Eagle's Medium“ mit 4,5 g/l Glucose (DMEM/HG), L-Glutaminsäure (L-Glu) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) und die Antikörper Mäuse-Anti-Neurofilament (68 kDa) und Mäuse-Anti-Glial-Fibrillary-Acidic-Protein (GFAP) von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Primäre Neuronen:

[0040] Die kortikale Zellkultur wurde aus den Gehirnen von 17-18 Tage alten Rattenembryonen nach einer modifizierten Prozedur erstellt (Freshney (1987) Culture of specific cell types. In: Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique, A.R. Liss, New York, S. 257-288; Perovic et al. (1994) Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharmacol. Sec.) 288:27-33). Nach der Isolierung wurden die Cerebral-Hemisphären in „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS) ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} gelegt und anschließend die neuronalen Zellen in HBSS mit Hilfe von 0,025 % (w/v) Trypsin (10 min; 37°C) dissoziiert. Die proteolytische Reaktion wurde mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FKS) abgebrochen. Die Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert und das resultierende Pellet in „Dulbecco's modified Eagle's Medium“ mit 4,5 g/l Glucose (DMEM/HG) (enthält 2 mM L-Glutamin, 100 mU/l Insulin und 10 % (v/v) FKS) aufgenommen. Die Zellen wurden in eine mit Poly-L-Lysin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 300 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) beschichtete Kammer mit einer Zelldichte von $2,0 \times 10^5$ Zellen/ cm^2 ausplattiert. Nach zwei Tagen wurde das DMEM/HG/10%-FKS-Medium entfernt und durch DMEM/HG/serumfreies Medium ersetzt. Zwei Wochen nach der Isolierung erfolgte die Immunfärbung mit Anti-Neurofilament 68 kDa als Marker für Neuronen und Anti-GFAP als Marker für Gliazellen. Die Kulturen beinhalteten > 80 % Neuronen; die restlichen 20 % waren GFAP-positive Zellen, hauptsächlich Astrozyten (Ushijima et al. (1995) Eur. J. Neurosci. 7:1353-9). Die Neuronen wurden in einer Atmosphäre aus 95 % Luft und 5 % CO_2 bei 37°C gehalten.

Seite 12 --- ()

Laden von Neuronen mit Fura-2-AM:

[0041] Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde durch Fluoreszenzmessungen bestimmt. Ausschlaggebend war das Verhältnis der Absorptionen des Ca^{2+} -Indikatorfarbstoffes Fura-2-AM bei 340 und 380 nm (Grynkiewicz et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:3440-50). Die Neuronen wurden mit 8 μM Fura-2-AM in DMEM/HG/serumfreiem Medium (versetzt mit 1 % (w/v) Rinder Serumalbumin) 60 Minuten lang bei 37°C beladen. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und weitere 45 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Diese Inkubationszeit ist ausreichend, um die Neuronen zu beladen (inaktives Fura-2-AM) und den Acetoxymethylester (aktives Fura-2) zu hydrolysieren. Calcium-Kalibrierungskurve:

[0042] Eine Calcium-Kalibrierungskurve wurde nach den Methoden von Grynkiewicz et al. (1985, J. Biol. Chem. 260:3440-50) erstellt. Fluoreszenzbilder wurden für jeden Puffer bei 340 und 380 nm erhalten. Der Quotient aus den beiden Fluoreszenzspektren (340/380 nm) wurde berechnet und als Kalibrierungskurve dargestellt. Der Quotient (340/380 nm [Ratio-Wert]) von 1,0 entspricht 228 nM $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Änderungen des Calciumspiegels in Neuronen:

[0043] In allen Versuchsansätzen wurden die Zellen zuerst mit Fura-2-AM beladen und anschließend mit unterschiedlichen Substanzen (in Locke's Lösung; 154 mM NaCl; 5,6 mM KCl; 3,6 mM NaHCO_3 ; 5,6 mM Glucose und 10 mM Hepes; pH 7,4; ohne CaCl_2) stimuliert. Gephyromycin (1a) wurde in DMSO (10 mg/ml) gelöst und anschließend mit 100 % (v/v) FKS auf 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ verdünnt. Gephyromycin (1a) wurde 3 Tage lang bei 37°C inkubiert und nach der Inkubation bei -20°C gelagert. Neuronen wurden im ersten Ansatz mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gephyromycin (1a) und 2,5 mM CaCl_2 oder 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gephyromycin (1a), 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-Glutaminsäure (L-Glu) und 2,5 mM CaCl_2 inkubiert. Der Zeitpunkt der Zugabe war nach 10 Minuten. Im zweiten Ansatz wurde die Auswirkung von 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ L-Glu und 2,5 mM oder nur 2,5 mM CaCl_2 auf den Calciumspiegel vorinkubierter Neuronen (jeweils 5 min mit 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der Substanz 1a) getestet. Der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Spiegel wurde in allen Experimenten mindestens 23-25 min lang gemessen.

[0044] Zur Bestimmung des $[Ca^{2+}]_i$ wurden die Zellen auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Borsilikat-Deckgläsern im 4-Kammer-System (Lab-Tek[®] Chamber Slide[™] System; Nunc, Wiesbaden, Deutschland) kultiviert. Die Fluoreszenzmessungen wurden mit einem "inverted-stage"-Mikroskop (Olympus IX70) mit apochromatisch reflektiertem Licht und dem Fluoreszenzobjektiv UApo40X/340 durchgeführt. Die Zellen wurden alternierend mit Licht der Wellenlängen 340 und 380 nm mit Hilfe eines computergesteuerten Schmalband-Interferenzfilters vor einer 100-W-Xenon-Lampe beleuchtet. Zusätzlich wurde bei 380 nm ein 0,25-ND-Filter benutzt. Die Fluoreszenzemissionen bei 510 nm wurden mit einer CCD-Kamera (Modell C2400-87; Hamamatsu, Herrsching, Deutschland) aufgezeichnet. Die Bilder wurden computergestützt mit dem Imaging-System Argus 50, Hamamatsu, als 256 \times 256 Pixel mit 8-bit-Arrays digitalisiert. Der Fluoreszenzquotient 340/380 nm wurde durch Division der Bilderpaare ermittelt.

Statistik:

[0045] Die Ergebnisse wurden mittels des gepaarten "Student's t-test" (Sachs (1984) Angewandte Statistik. Springer, Berlin) ausgewertet.

B) Ergebnisse Einfluß von Gephyromycin (1a) und L-Glutaminsäure auf $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel in neuronalen Zellen:

[0046] Inkubation der Zellen mit 3 μ g/ml Gephyromycin (1a), 200 μ M L-Glutaminsäure und 2,5 mM Ca^{2+} (**Abb. 3**) ergab einen starken Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ nach 10 Minuten. Am Ende der Messung stiegen die 340-/380-nm-Werte von 0,845 \pm 0,042 auf 1,826 \pm 0,075 (216,1 %). Eine Präinkubation der Neuronen mit 3 μ g/ml Gephyromycin (1a) bewirkte eine Zunahme des $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegels nach der Zugabe von Gephyromycin. Die Werte stiegen von 0,782 \pm 0,029 auf 1,544 \pm 0,046 (197,4 %) und auch nach der Zugabe von 200 μ M L-Glu und 2,5 mM $CaCl_2$ (von 1,094 \pm 0,029 auf 1,658 \pm 0,046 (151,6 %); **Fig. 3**).

Einfluß von Gephyromycin (1a) und 2,5 mM $CaCl_2$ auf $[Ca^{2+}]_i$ -Spiegel in neuronalen Zellen:

[0047] Zugabe von 3 μ g/ml Gephyromycin (1a) und 2,5 mM Ca^{2+} zu den Zellen (**Abb. 4**) ergab einen starken

Seite 13 --- ()

Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ nach 10 Minuten. Die 340-/380-nm-Werte stiegen von 0,768 \pm 0,027 auf 2,019 \pm 0,049 (262,9 %) (**Abb. 4**). Die Zunahme der freien Calciumkonzentration in Neuronen nach Präinkubation mit 3 μ g/ml Gephyromycin (1a) und anschließender Inkubation mit 2,5 mM $CaCl_2$ war sehr hoch. Nach der Zugabe von Gephyromycin stiegen die Calcium-Werte von 0,811 \pm 0,027 auf 1,730 \pm 0,071 (213,3 %) und nach der Zugabe von 2,5 mM $CaCl_2$ von 1,434 \pm 0,067 auf 2,219 \pm 0,083 (154,7 %) (**Abb. 4**).

C) Schlußfolgerung

[0048] Es wurde gefunden, daß Neuronen, die mit Gephyromycin (1a) inkubiert oder präinkubiert wurden, nach Zugabe von L-Glutaminsäure und 2,5 mM $CaCl_2$ oder nur 2,5 mM $CaCl_2$ eine starke Zunahme des intrazellulären Calciumspiegels zeigten. L-Glutaminsäure ist als Neurotransmitter in vielen Prozessen des ZNS involviert. Calcium als "Second Messenger" spielt in vielen Prozessen eine entscheidende Rolle. Aufgrund dieser Eigenschaften (wirkt wie ein Agonist von Glutamat) könnte Gephyromycin (1a) sehr erfolgreich bei der Behandlung von Erkrankungen des ZNS eingesetzt werden.

Verbindung nach der allgemeinen Formel 1: worin R_1 bis R_{13} unabhängig voneinander entweder H, ein unsubstituiertes, monosubstituiertes oder polysubstituiertes C_1 - C_{18} -Alkyl, wobei das Alkyl gerade, verzweigt oder cyclisch sein kann, Alkenyl, ein unsubstituierter, monosubstituierter oder polysubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest, eine unsubstituierte, monosubstituierte oder polysubstituierte Benzylgruppe, eine Acylgruppe, wie Formyl, Acetyl, Trichloracetyl, Fumaryl, Maleyl, Succinyl, Benzoyl, oder eine verzweigte oder Heteroatom- oder arylsubstituierte Acylgruppe, -OH oder -SH ein Alkoxy substituent, wie -OMe, -OEt, -ONPr, -OiPr, -ONBu, -OiBu, -OSecBu, -OtBu, dessen Alkylgruppe verzweigt, unverzweigt oder cyclisch ist, eine über ein Schwefelatom gebundene Alkylgruppe, wie -SMe, -SEt, oder eine Sulfonylgruppe, wie -SO₃H, -SO₂Me, -SO₂CF₃, -SO₂C₆H₄CH₃ oder SO₂C₆H₄CH₂Br, oder ein Stickstoffsubstituent, wie -NH₂, -NHR', -NRR' (mit R, R' = Alkyl, Aryl usw.), -NC oder -NO₂, oder Fluor, Chlor, Brom, Iod, -CN oder ein Heterosubstituent sind,

oder sich an Stelle von einem oder mehreren der Substituentenpaare R_1/R_2 , R_4/R_5 , R_6/R_7 und R_8/R_9 eine Ketofunktion befindet, R_{14} , R_{15} und R_{16} unabhängig voneinander entweder H, ein unsubstituiertes, monosubstituiertes oder polysubstituiertes C_1 - C_{18} -Alkyl, wobei das Alkyl gerade, verzweigt oder cyclisch sein kann, Alkenyl, ein unsubstituierter, monosubstituierter oder polysubstituierter Aryl- oder Heteroarylrest, eine unsubstituierte, monosubstituierte oder polysubstituierte Benzylgruppe, eine Acylgruppe, wie Formyl, Acetyl, Trichloracetyl, Fumaryl, Maleyl, Succinyl, Benzoyl, oder eine verzweigte oder Heteroatom- oder arylsubstituierte Acylgruppe, oder eine Sulfonylgruppe, wie -SO₃H, -SO₂Me, -SO₂CF₃, -SO₂C₆H₄CH₃ oder SO₂C₆H₄CH₂Br sind, und deren Enantiomere, sowie pharmazeutisch verträgliche Salze und Solvate davon. Verbindung nach Anspruch 1 mit der Formel 1a:

Seite 14 --- ()

1a (Gephyromycin) oder Derivate davon, deren Diastereomere, sowie die entsprechenden Enantiomere und pharmazeutisch verträgliche Salze oder Solvate dieser Verbindung. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2, umfassend Kultivieren eines Bakterium der Gattung Streptomyces auf an sich bekannte Weise und Isolieren mindestens einer erfindungsgemäßen Verbindung aus dem Kulturmedium und/oder der Bakterienbiomasse. Verfahren nach Anspruch 3, weiterhin umfassend eine anschließende synthetische Derivatisierung der isolierten Verbindung. Verfahren zur Synthese einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 umfassend

a) Bereitstellung 'offenkettiger' (d.h. tetracyclischer) Angucyclinone durch Isolierung, Partialsynthese oder durch Totalsynthese,

b) Epoxidierung der Angucyclinone und anschließende Cyclisierung unter Epoxid-Öffnung, und

c) gegebenenfalls weitere Modifizierung durch Derivatisierung. Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 als Medikament zur Behandlung von Erkrankungen. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 zusammen mit geeigneten Zusatz- oder Hilfsstoffen. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in Form einer Depotsubstanz oder als Vorläufer zusammen mit einer geeigneten, pharmazeutisch verträglichen Verdünnungslösung oder Trägersubstanz vorliegt. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in einer Menge von 20 μ g vorliegt. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Verbindung in einer Menge vorliegt, daß ein Konzentrationsbereich zwischen 0,3 und 10,0 μ g/ml bei der Behandlung in vivo vorliegt. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 bis 10 in Form von Tabletten, Dragees, Kapseln, Tropflösungen, Suppositorien, Injektions- oder Infusionszubereitungen zur peroralen, rektalen oder parenteralen Verwendung. Verwendung einer Verbindung nach Anspruch 1 oder 2 oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 7 bis 10, zur Modulierung des intrazellulären Calcium-Spiegels oder der Behandlung von bakteriellen Infektionen. Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Seite 15 --- ()

Seite 16 --- ()

Seite 17 --- ()

Seite 18 --- ()